

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-13054

(P2001-13054A)

(43) 公開日 平成13年1月19日 (2001.1.19)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード^{*} (参考)

G 0 1 N 5/02

G 0 1 N 5/02

A

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平11-184177

(22) 出願日 平成11年6月29日 (1999.6.29)

(71) 出願人 597145779

アマシャム ファルマシア バイオテック株式会社

東京都新宿区百人町3丁目25番1号 サンケンビルディング

(72) 発明者 曾田 裕行

埼玉県大宮市高鼻町1-309 晴美荘202号

(72) 発明者 長谷川 幸雄

千葉県市川市中国分5-9-11

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

(54) 【発明の名称】 水晶発振子を用いた液滴中の溶質濃度測定方法

(57) 【要約】

【課題】 蛋白質結晶化反応過程の溶質濃度を容易にかつ正確に把握する手法を提供すること。

【解決手段】 水晶発振子の検出電極上に目的の蛋白質結晶化のための蛋白質を溶解させた液滴を置き、結晶化反応中の液滴からの水分蒸散に伴う液滴溶液内の溶質の濃度変化を、液滴重量の変化を水晶発振子の基準発振周波数の変化から定量することにより、液滴仕込み時の溶質（蛋白質および結晶化試薬）の初期濃度と合わせて、蒸散過程の溶質濃度を算出する。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 水晶発振子の検出電極上に目的の蛋白質結晶化のための蛋白質を溶解させた液滴を置き、結晶化反応中の液滴からの蒸散に伴う液滴溶液内の溶質の濃度変化を、液滴重量の変化を水晶発振子の基準発振周波数の変化から定量することにより、液滴仕込み時の溶質（蛋白質および結晶化試薬）の初期濃度と合わせて、蒸散過程の溶質濃度を算出することを特徴とする水晶発振子を用いた液滴中の溶質濃度測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、水晶発振子を用いた液滴中の溶質濃度測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】蛋白質の結晶体は、蛋白質の立体構造を解明する上で現在最も優れておりかつ最も普及した手法であるX線解析技術に必須の試料である。X線解析技術はかなり自動化が進んでいるが、その前段階である蛋白質の結晶化は試行錯誤にほとんど頼っている。このため、蛋白質の立体構造解明のための作業には時間と手間がかかるのが現状である。

【0003】反面、分子生物学の急速な発展により、蛋白質の正確な立体構造に基づいて、バイオテクノロジーあるいは化学の手法を用いて人工的な機能性分子を設計する手法が大きな発展を遂げており、現在、創薬等の研究手法としてますます重要性を増している。このような状況下で、元手となる蛋白質結晶体取得の問題は火急の解決課題として表面化している。また、既に構造が決定された蛋白質においても、不均一な結晶体のためにX線結晶解析時に解像度の低い像しか得られず、大雑把な構造解析にとどまっているため、分子設計技術に資することのできない蛋白質も数多い。この問題を解決するためには均一性の高い結晶を精密な反応過程を実現することにより得る必要がある。

【0004】従来、蛋白質の結晶化技術および結晶化反応の過程における溶質濃度を正確に把握する技術に関していくつかの提案がなされている。蛋白質結晶化反応のモニタリングに関する技術として、特開平4-216441号公報には、蛋白質溶液のような生体高分子溶液と結晶化剤を結晶化セルに装入し、紫外光源からの紫外光を該結晶化セルに照射し、該結晶化セルを透過した紫外光をリニアセンサーにより2次元に走査して透過光量を検出し、検出した透過光量より吸光度を算出するなどして蛋白質濃度換算を行うことを特徴とする生体高分子の2次元測定方法が記載されている。しかし、紫外光を用いる方法では、紫外光を吸収する蛋白質は測定可能であるが、その他の溶質（塩類等の結晶化試薬）は通常有効な吸収を紫外領域に持ち得ないので測定の対象外となる。また、結晶化直前の可溶状態の蛋白質凝集体や不溶化した蛋白質結晶体は透過光に対して不適切な散乱を引

き起こす原因となり、定量性が著しく損なわれる恐れがある。

【0005】蛋白質結晶化反応は、目的となる蛋白質を溶解させてかつ蛋白質沈殿作用を有する無機塩類、有機化合物や有機溶媒などの沈殿剤と呼ばれる結晶化試薬を含む液滴を、密閉された小型容器中の容器固体内表面などに吸着させ、その液滴とは接しない容器中に、蛋白質を含まずかつ液滴中よりもより高い濃度の結晶化試薬を含むリザーバー溶液を置いて、液滴からリザーバー溶液への水の気相を介した物質移動を起こさせ、蛋白質および結晶化試薬の濃度を徐々に高めて結晶化にふさわしい濃度に達せしめることにより行うのが通例である。しかし、液滴が数マイクロリットルから数十マイクロリットルの容量であること、さらに、液滴が密閉容器中に置かれてしまうこと等から、反応を開始するに当たって結晶化試薬や蛋白質の初期濃度は望む値に制御できても、反応開始後の蒸散過程に伴う溶質（結晶化試薬や蛋白質）の時間変化は追跡することが不可能で、結晶化が成功してもそれを初期濃度と結晶化容器に因果関係づけることしか出来なかった。すなわち、最適な結晶化反応を行わせるために、通常溶質の初期濃度を様々に変えて組み合わせるため、検索が行われるが、たとえ結晶化する条件が見つかったとしても、結晶化の起こるまさにその時の蛋白質および結晶化試薬の濃度を正確に把握できているわけではないので、その濃度から立ち戻って、無駄な蒸散時間を省いて高速化したり、不均一性の高い結晶体しか得られなかった場合に、狭い検索濃度・組み合わせ範囲を微調整するために必要な初期条件の最適化が困難であった。また、最近では蛋白質の結晶化にはその初期段階である核形成とそれに引き続く結晶成長とはそれぞれ最適な溶質濃度があり、核形成よりも結晶成長の方が比較的低い濃度を要求する例などが報告されていることから、これまでの単純な蒸散過程に導かれた一方的な濃度上昇では効率的な結晶化反応が達成できない可能性が示唆されている。すなわち、このような洗練された手法を適用して結晶化反応を行うには、蒸散過程をある濃度で正確に止めたり、あるいはリザーバー溶液を過程途中（核形成から結晶成長へ移る段階）で交換して濃度を減ずる方向に制御しなければならない必要性が生じている。いずれにしても結晶化反応に対して反応過程の溶質濃度を正確に把握することは望まれてきたが、先述のようにそれを達成する手段が提案されていなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、これまで経験と試行錯誤にのみほとんど頼っていた蛋白質結晶化反応過程の科学的洗練化を図るための手法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記問題を解決するための手法を種々の観点から検討した結

果、水晶発振子を利用することにより蛋白質結晶化反応の反応過程における溶質濃度を正確に把握することが可能であることを見だし、かかる知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち、本発明は、水晶発振子の検出電極上に目的の蛋白質結晶化のための蛋白質を溶解させた液滴を置き、結晶化反応中の液滴からの水分蒸散に伴う液滴溶液内の溶質の濃度変化を、液滴重量の変化を水晶発振子の基準発振周波数の変化から定量することにより、液滴仕込み時の溶質（蛋白質および結晶化試薬）の初期濃度と合わせて、蒸散過程の溶質濃度を算出することを特徴とする水晶発振子を用いた液滴中の溶質濃度測定方法を提供する。

【0009】蛋白質結晶化の方法として、前記特開平4-216441号公報には、測定法に合わせて直接混合法（同公報図2（A））あるいは隔膜法（同公報図2（B））を使用することが教示されている。一方、現状までの蛋白質結晶化反応において、簡便なため最もよく用いられ、かつ情報の集積がなされているのは液滴を用いて試料蛋白質溶液とリザーバー溶液を隔離し、蒸散を駆動力とするハンギング・ドロップ法あるいはシッティング・ドロップ法である。前者と後者の違いは、水平な固体表面に液滴を載せるか、表面張力で吊り下げるかの違いである。本発明の方法によればどちらも適用することができる。これが、本発明の利点の1つである。

【0010】

【発明の実施の形態】水晶発振子は主に結晶体全体が振動するバルク波タイプのものと、一部表面が振動する表面波タイプのものに分類される。またそれぞれのタイプには結晶面のカットがいくつかあり、そのカットの仕方によって厚み一すべり振動（AT-カット、BT-カット）、輪郭滑り（CT-カット、DT-カット）、結合モード（GT-カット）などと振動モードが異なり、使用可能な周波数領域や温度安定性などの特性が変わってくる。学術的に水晶発振子センサーとしてよく用いられるのは、AT-カットのバルク波のもので、これは数ある中でも高い基本周波数が得られること（センサーの原理より高い周波数＝高感度）と、温度などの環境因子に対しての安定性が高いことなどによる。しかし、本発明において使用する水晶発振子の種類は特に限定されない。水晶発振器は圧電性の結晶である水晶の固有振動を利用した発振器である。水晶は硬く熱膨張が小さいので、適当な軸でカットして板状にしたものに電極を貼った水晶振動子は、LC共振回路と同じ等価回路を有しQ値が非常に高いため、安定な周波数の発振器を作ることができる。水晶発振子は質量センサーとしてよく知られている。また、水晶発振子が電極表面上に吸着した物質の質量に比例してその基本発振周波数を変化させることは公知の事実として知られており、その関係は以下のSauerbreyの式として表現される。

$$\Delta F = -2 F_0^2 \Delta m A^{-1} (\rho_q \mu_q)^{-0.5}$$

ここで、 F_0 は水晶発振子の基本発振周波数（Hz）； ΔF は周波数変化； Δm は電極表面上での質量変化； A は電極面積（定値）； ρ_q は水晶の密度（定値）； μ_q は水晶の剪断定数（定値）である。

【0011】なお、上記バルク波タイプ的水晶発振子と表面波タイプ的水晶発振子のどちらも基本的にSauerbreyの式に従って質量センサーとして利用することができる。

【0012】水晶発振子の大きさやセンサー表面が、一般の蛋白質結晶化にふさわしい容器の中に置かれかつ結晶化溶液滴を吸着するにふさわしい平面を容易に提供できることから、結晶化容器中に置いて液滴の蒸散過程に伴う重量の変化を実時間で測定することができ、既知の初期濃度から溶液中の溶質濃度を容易に推算する手法を可能にする。なおかつ、現状の水晶発振子の実用的感度は1ナノグラム程度までは十分あり、これは重量測定法としては数百マイクログラム程度までしか測ることができない精密型の機械式秤量器をもってしては達し得ない変化範囲であり、先述した液滴の初期容量から推し量ってもppmオーダーの変化を捉え得ることになり、当初の目的を達するに十分である。

【0013】また、本発明は上蓋が結晶観察用に透明になった蛋白質結晶化反応に通常用いられる容器の形状をほとんど変えることなく配置できることから、その上蓋上方から顕微鏡およびカメラ等からなる画像記録装置を水晶発振子センサーの記録と同時に並行に作動させれば、容易に結晶化とその時点の溶質濃度との相関関係が導き出せる。先に述べた結晶化反応の洗練化に大きな貢献を果たすシステムを提供することができる。

【0014】なお、本発明の測定方法において用いられる蛋白質の結晶化試薬の種類は特に制限されない。したがって、これは、溶液中の懸濁物などによる異常な屈折・分散により悪影響を受けやすい光学的手法とは異なる本法の利点である。本発明の測定方法においては通常用いられているいずれの結晶化試薬も利用することができる。結晶化試薬の具体例として、無機塩類（例えば、硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、硫酸ナトリウム、リン酸塩類、塩化セシウム等）、有機化合物（例えば、ポリエチレングリコール、糖類、グリシン等）および水混合性の溶媒（例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトニトリル等）を挙げることができる。

【0015】

【実施例】以下に本発明方法による液滴中の溶質濃度の測定の一例を図をもとにして説明する。

【0016】図1に、本発明の測定方法に用いられる水晶発振子センサー部分の一例を示す。図1の（a）に示されているように、円形的水晶結晶板の両方の平面部分に蒸着金属電極を設けて電極からのリード線を接続す

(4) 開2001-13054 (P2001-18悖繰

る。電極部分は平面状であるため、図1(b)に示すように、測定の対象となる液滴試料を電極上に載置してリード線を発振回路につなぐことにより測定が可能となる。

【0017】図2は、このようにして準備した液滴試料を用いて蛋白質結晶化溶液の濃度を実時間で測定する装置の一例を示す。液滴試料を載置した水晶発振子センサーを結晶化反応容器（密閉容器）中に封入し、水晶発振子センサーのリード線を発振回路につなぐとともに発振回路を周波数カウンターに接続する。結晶化反応容器の上蓋上方に顕微鏡およびカメラ等からなる結晶化像の観察および画像記録のための装置（図示せず）を設ける。この装置を水晶発振子センサーの記録と同時並行に作動させることによって、蛋白質結晶化とその時点の溶質の濃度との相関関係が導き出すことができる。なお、蛋白質反応容器中では水晶発振子センサーが、ハンギング・ドロップあるいはシッティング・ドロップのために水平に、かつ水晶発振子の発振そのものを物理的に抑制されないために結晶板は2本のリード線のみにて支持されて

いる。

【0018】

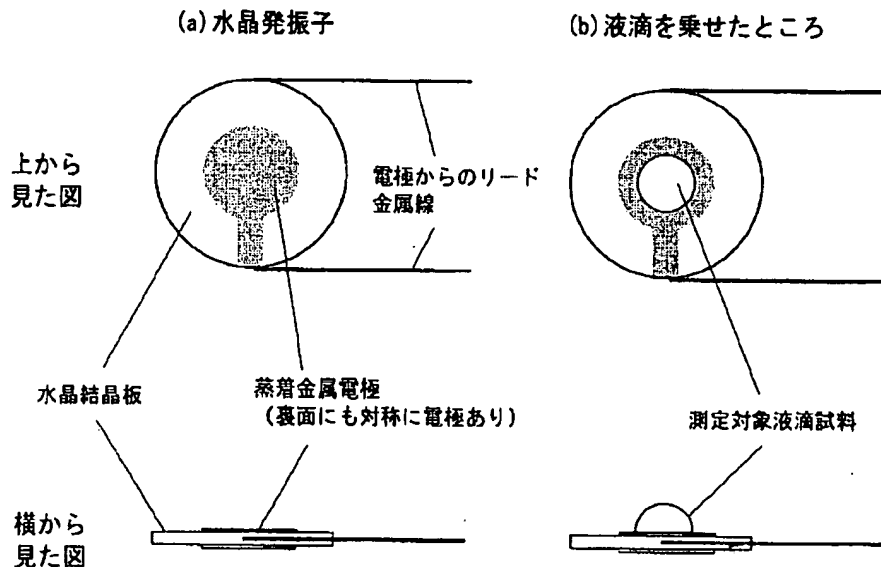
【発明の効果】本発明は、これまで経験と試行錯誤にのみほとんど頼っていた蛋白質結晶化反応過程の科学的洗練化を図る上で重要な進歩を提供することができる発明である。本発明は、蛋白質の結晶化条件の検索に有用であるのみならず、結晶の高純度化にも貢献できる指標である溶質濃度と結晶化反応相関関係を既存の結晶化作業をほとんど変えることなく提供できる点で、産業上極めて実用性の高い発明であると言える。もちろん、本発明は、蛋白質の化学的基礎研究あるいは物理的基礎研究にも資するところ大であると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の測定方法に用いられる水晶発振子センサー部分の一例を示す図である。

【図2】本発明の測定方法によって蛋白質結晶化溶液の溶質濃度を実時間で測定する装置の一例を示す図である。

【図1】



(5) 開2001-13054 (P2001-1JGA)

【図2】

